

Г. А. ДЕБОРИН и Л. Б. ГОРБАЧЕВА

**КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С ЛИПОИДАМИ И ИХ СВОЙСТВА**

**ВЛИЯНИЕ pH И ГУАНИДИНА НА УСТОЙЧИВОСТЬ КОМПЛЕКСА  
ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА С ЭРГОСТЕРОЛОМ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 8 I 1954)

В предыдущем сообщении (1) нами было установлено, что поглощение эргостерола яичным альбумином приводит к образованию и сохранению как в объеме раствора, так и в поверхностном слое белково-стеролового комплекса, состоящего из двух молекул белка и одной молекулы эргостерола. Для исследования обратимости этого процесса и границ устойчивости комплекса нами изучалось влияние pH, а также различных концентраций гуанидина на стабильность получаемого комплекса.

Получение комплексов яичного альбумина с эргостеролом и их исследование проводилось методом, описанным ранее. Отличие состояло в том, что pH подкладки (5% раствор сернокислого аммония) изменялось нами в различных опытах от 2 до 7 прибавлением к раствору серной кислоты или аммиака. pH раствора определялось при помощи лампового потенциометра со стеклянным электродом (ЛП-5). В этих опытах значение pH раствора комплекса оставалось постоянным, равным 4,35. Молекулярный вес белка в монослое рассчитывался по изотерме сжимаемости монослоя белка (2). Полученные в этой серии опытов результаты даны в табл. 1.

Из этих данных видно, что pH подкладки существенно влияет на устойчивость белково-стеролового комплекса, образовавшегося в объеме при pH 4,35. Комплекс сохраняется на поверхности лишь при значениях pH подкладки, лежащих между 4 и 5, т. е. близких к изоэлектрической точке белка. При значениях pH более кислых и более щелочных, чем в этом интервале, образовавшийся в объеме комплекс распадается на свои составные части. Следует подчеркнуть, что при одном и том же значении исходной концентрации белка в поверхностном слое, равной 0,615 мг/м<sup>2</sup>, образование комплекса приводит к заметному возрастанию предельной площади белка в монослое, а распад комплекса приводит снова к ее падению. Эти данные вполне совпадают с нашими прежними результатами (1, 3).

Таблица 1

Влияние pH подкладки на устойчивость комплекса яичного альбумина с эргостеролом (pH раствора комплекса 4,35)

pH подкладки	Исходн. конц. в мг/м <sup>2</sup>	Предельн. площадь в м <sup>2</sup> /мг	Мол. вес
2,2	0,615	0,732	40000
3,0	0,615	0,732	40000
3,6	0,615	0,700	40000
4,0	0,615	0,83	80000
4,35	0,615	0,85	80000
5,0	0,615	0,9	80000
6,0	0,615	0,715	40000
7,3	0,765	0,970	40000

Представлялось также важным выяснить, в каком интервале рН происходит образование комплекса в объеме. Для этого образование комплекса проводилось при различных значениях рН раствора, а определение его молекулярного веса в монослое проводилось при значении рН

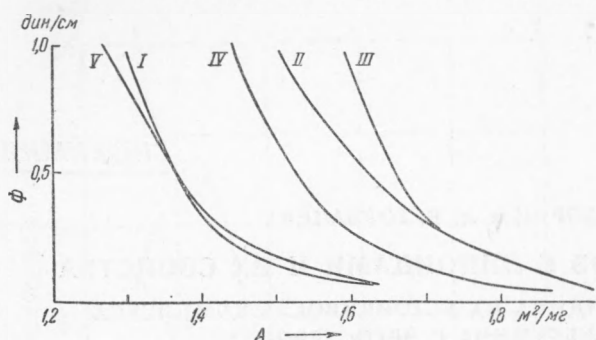


Рис. 1. Изотермы сжимаемости монослоя яичного альбумина при различных значениях рН в объеме.  $\Phi$  — давление,  $A$  — площадь

от рН в объеме раствора и в подкладке. Интервал оптимальных значений рН в обоих случаях совпадает.

Для того чтобы выяснить, является ли обратимым процесс образования белково-стеролового комплекса, мы попытались простым изменением рН раствора сдвигать равновесие в системе мономер — димер в ту или иную сторону. Опыт проводился следующим образом. Комплекс с молекулярным весом 80000 получался обычным образом при рН объема 4,65 (кривая I на рис. 1). Затем к 4,3% раствору комплекса добавлялся ацетатный буфер (рН 6,22) в количестве, необходимом для смещения рН раствора до значения 6,0. Небольшая часть раствора отбиралась, и снималась изотерма сжимаемости монослоя белка. При этом значение молекулярного веса яичного альбумина оказалось равным 40000 (кривая II на рис. 1). Затем при помощи ацетатного буфера (рН 3,8) рН реакционной смеси доводилось до значения 4,3. Определение молекулярного веса белка в монослое дало значение 40000 (кривая III на рис. 1).

Таким образом, сдвиг рН раствора белка с эргостеролом до значения, при котором между ними происходит образование комплекса, не привело к комплексированию. Для того чтобы образование комплекса осуществилось, оказалось необходимым перемешать реакционную смесь в течение 10 мин. Однако перемешивание при 20° не привело к образованию комплекса, а лишь к некоторому возрастанию площади белка в монослое, происходящему, повидимому, в результате частичной денатурации белка при растирании (кривая IV на рис. 1). Лишь после 10 мин. перемешивания раствора при 37° комплекс образовался, на что указывает значение его молекулярного веса в монослое, равное 80000 (кривая V на рис. 1).

подкладки 4,35 — оптимальном для сохранения комплекса в монослое. Данные этих опытов приведены в табл. 2.

Из этой таблицы видно, что оптимальное значение рН для образования комплекса яичного альбумина с эргостеролом также лежит вблизи изоэлектрической точки белка. Таким образом, очевидно, что устойчивость комплекса и само его образование сильно зависят

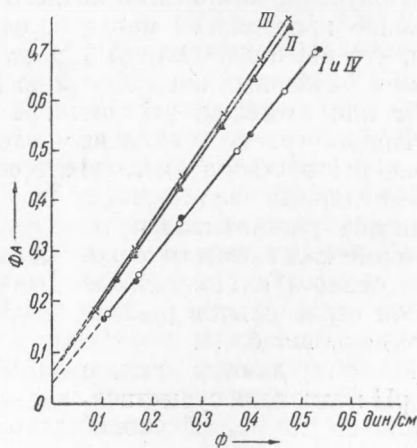


Рис. 2. Зависимость произведения  $\Phi A$  от давления  $\Phi$ , рассчитанная из изотерм сжимаемости монослоя белка, приведенных на рис. 1

Таким образом, из рассмотрения результатов этих опытов, представленных на рис. 1 и 2, следует, что равновесие мономер — димер обратимо и его можно сдвигать в ту или иную сторону изменением значения рН. Изотермы сжимаемости монослоев при этом полностью воспроизводятся и при одинаковых значениях рН хорошо совпадают. Однако для образования комплекса, которое, повидимому, нуждается в преодолении какого-то активационного барьера, необходимо осуществить энергичное перемешивание раствора. Более детальный разбор механизма комплексообразования будет выполнен нами в дальнейшем.

Исследовалось также влияние различных концентраций денатурирующих агентов на устойчивость белково-стеролового комплекса. Для опытов использовался солянокислый гуанидин, перекристаллизованный из 80% этилового спирта. Результаты этих опытов приведены в табл. 3.

Таблица 2  
Влияние рН объема на образование комплекса яичного альбумина с эргостеролом (рН подкладки 4,35)

рН объема	Исходн. конц. в мг/м <sup>2</sup>	Предельн. площадь в м <sup>2</sup> /мг	Мол. вес
3,0	0,561	1,06	40000
4,3	0,615	0,86	80000
6,12	0,727	1,04	40000

Таблица 3

Влияние различных концентраций солянокислого гуанидина на устойчивость комплексов яичного альбумина с эргостеролом (рН подкладки 4,35)

Конц. гуанидина в мол.	рН в объеме	Предельн. площадь в м <sup>2</sup> /мг	Исходн. конц. в мг/м <sup>2</sup>	Мол. вес
0,6	5,0	1,55	0,435	80000
1,25	5,5	1,46	0,435	80000
1,75	5,75	1,34	0,435	40000
2,25	6,0	0,715	0,544	40000
3,0	6,25	0,750	0,675	40000

Таблица 4

Влияние различных концентраций гуанидина на устойчивость комплекса яичного альбумина с эргостеролом (рН раствора в объеме 4,17, на поверхности 4,35)

Конц. гуанидина в мол.	Исходн. поверхн. центр. в мг/м <sup>2</sup>	Предельн. площадь в м <sup>2</sup> /мг	Мол. вес
1,5	0,727	1,07	80000
2,5	0,727	0,643	80000

Из этих данных видно, что изменение концентрации гуанидина приводит к изменению рН раствора белка, и поэтому нельзя сделать однозначный вывод о том, какой из этих факторов влияет на образование комплекса. Для выяснения этого вопроса нами были поставлены опыты с добавлением солянокислого гуанидина, в которых значение рН поддер-

живалось постоянным при помощи ацетатного буфера. Эти данные приведены в табл. 4.

Отсюда следует, что добавление к раствору белково-эргостеролового комплекса больших концентраций солянокислого гуанидина (до 2,5 мол.) не приводит к распаду комплекса, если значение рН поддерживать на оптимальном уровне.

Таким образом, определяющим фактором в устойчивости комплекса является рН раствора. Возможно, однако, что при перенесении раствора белка с гуанидином в монослой гуанидин уходит в подкладку и его действие прекращается.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
Академии наук СССР

Поступило  
4 I 1954

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Г. А. Деборин, Л. Б. Горбачева, Биохимия, **18**, № 5 (1953). <sup>2</sup> Н. В. Вилл, Adv. Prot. Chem., **3**, 95 (1947). <sup>3</sup> Г. А. Деборин, Л. Б. Горбачева, ДАН, **82**, 943 (1952); **85**, 843 (1952).